

**BEST AVAILABLE COPY****METHOD FOR EFFICIENTLY CREATING TRANSGENIC BIRDS, AND  
TRANSGENIC BIRDS OBTAINED THEREBY****Publication number:** JP2002176880**Also published as:****Publication date:** 2002-06-25

WO0247475 (A1)

**Inventor:** IIJIMA SHINJI; KAMIHIRA MASAMICHI; NISHIJIMA  
KENICHI; MIZUARAI SHINJI; ONO KENICHIRO

US2005022260 (A)

**Applicant:** KANEYAFUCHI CHEMICAL IND**Classification:****- international:** A01K67/027; C07K14/435; C12N5/10; C12N15/09;  
C12N15/85; A01K67/027; C07K14/435; C12N5/10;  
C12N15/09; C12N15/85; (IPC1-7): A01K67/027;  
C12N5/10; C12N15/09**- european:** A01K67/027M; C07K14/435A5; C12N15/85A**Application number:** JP20000377549 20001212**Report a data error here****Abstract of JP2002176880**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide G0 transgenic chimera birds having the objective genes or gene sequences in the germ cells at high efficiency, and capable of being propagated to posterity, and a method for creating the transgenic chimera birds, and further to provide transgenic birds having the objective genes or gene sequences in the somatic cells and the germ cells, and a method for creating the transgenic birds. **SOLUTION:** The G0 transgenic chimera birds obtained by the gene transfer by using a retrovirus vector in the replication-defective type has >=10% propagation efficiency of the transferred gene to the G1.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-176880

(P2002-176880A)

(43)公開日 平成14年6月25日 (2002.6.25)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>A 01 K 67/027  
C 12 N 5/10  
15/09

識別記号

F I

A 01 K 67/027  
C 12 N 5/00  
15/00マークト<sup>7</sup>(参考)4 B 0 2 4  
B 4 B 0 6 5  
A

審査請求 未請求 請求項の数44 OL (全 15 頁)

(21)出願番号

特願2000-377549(P2000-377549)

(22)出願日

平成12年12月12日 (2000.12.12)

(71)出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72)発明者 飯島 信司

愛知県名古屋市天白区高島二丁目706番地

(72)発明者 上平 正道

愛知県名古屋市千種区城木町2-71-603

(72)発明者 西島 譲一

愛知県名古屋市千種区鹿子町6丁目22番地

シャトー鹿子1A

(74)代理人 100086586

弁理士 安富 康男 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 効率的な遺伝子導入鳥類の作製法及びそれによって得られる遺伝子導入鳥類

## (57)【要約】

【課題】 目的とする遺伝子又は遺伝子配列を極めて高い効率で生殖細胞に有し、子孫へ伝播するG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類及びそれらの作製法、並びに、目的とする遺伝子又は遺伝子配列を体細胞及び生殖細胞に有するトランスジェニック鳥類及びそれらの作製法を提供する。

【解決手段】 複製能欠失型レトロウイルスベクターによって遺伝子導入されたG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類であって、導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が10%以上であるG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 複製能消失型レトロウイルスベクターによって遺伝子導入されたG。トランスジェニックキメラ鳥類であって、導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が10%以上であることを特徴とするG。トランスジェニックキメラ鳥類。

【請求項2】 複製能消失型レトロウイルスベクターがモロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルスに由来するベクターである請求項1記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類。

【請求項3】 導入遺伝子がレトロウイルスに由来しない遺伝子配列を有する請求項1又は2記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類。

【請求項4】 レトロウイルスに由来しない遺伝子配列がネオマイシン耐性遺伝子配列又はグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子配列である請求項3記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類。

【請求項5】 鳥類がニワトリ又はウズラである請求項1~4のいずれか1項記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類。

【請求項6】 VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能消失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させることからなる導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が10%以上であるG。トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

【請求項7】 複製能消失型レトロウイルスベクターがモロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルスに由来するベクターである請求項6記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

【請求項8】 導入遺伝子がレトロウイルスに由来しない遺伝子配列を有する導入遺伝子である請求項6又は7記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

【請求項9】 レトロウイルスに由来しない遺伝子配列がネオマイシン耐性遺伝子配列又はグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子配列である請求項8記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

【請求項10】 鳥類がニワトリ又はウズラである請求項6~9のいずれか1項記載のG。トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

【請求項11】 モロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルスに由来する複製能消失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させ、導入遺伝子を有するG。トランスジェニックキメラ鳥類を得、更に成長させ、交配させることからなるトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項12】 G。トランスジェニックキメラ鳥類の導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が、10%以上である請求項11記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項13】 トランスジェニック鳥類が導入遺伝子を複数コピー有するトランスジェニック鳥類である請求

項11又は12記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項14】 導入遺伝子がレトロウイルスに由来しない遺伝子配列を有する導入遺伝子である請求項11~13のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項15】 レトロウイルスに由来しない遺伝子配列がネオマイシン耐性遺伝子配列又はグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子配列である請求項14記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項16】 親鳥類とは異なる遺伝的形質を有する請求項11~15のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項17】 親鳥類とは異なる遺伝的形質がアルビノである請求項16記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項18】 鳥類がニワトリ又はウズラである請求項11~17のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

20 【請求項19】 モロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルスに由来する複製能消失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させ、導入遺伝子を有するG。トランスジェニックキメラ鳥類を得、更に成長させ、交配させることから得られるトランスジェニック鳥類。

【請求項20】 G。トランスジェニックキメラ鳥類の導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が、10%以上である請求項19記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項21】 導入遺伝子を複数コピー有する請求項19又は20記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項22】 導入遺伝子がレトロウイルスに由来しない遺伝子配列を有する導入遺伝子である請求項19~21のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項23】 レトロウイルスに由来しない遺伝子配列がネオマイシン耐性遺伝子配列又はグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子配列である請求項22記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項24】 親鳥類とは異なる遺伝的形質を有する請求項19~23のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類。

40 【請求項25】 親鳥類とは異なる遺伝的形質がアルビノである請求項24記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項26】 鳥類がニワトリ又はウズラである請求項19~25のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項27】 VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能消失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させ、導入遺伝子を有するG。トランスジェニックキメラ鳥類を得、更に成長させ、交配させることからなるトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項28】 G。トランスジェニックキメラ鳥類の導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が、10%以上である請求項27記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項29】 トランスジェニック鳥類が導入遺伝子を複数コピー有するトランスジェニック鳥類である請求項27又は28記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項30】 複製能消失型レトロウイルスベクターがモロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルスに由来するベクターである請求項27～29のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項31】 導入遺伝子がレトロウイルスに由来しない遺伝子配列を有する導入遺伝子である請求項27～30のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項32】 レトロウイルスに由来しない遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子配列又はグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子配列である請求項31記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項33】 親鳥類とは異なる遺伝的形質を有する請求項27～32のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項34】 親鳥類とは異なる遺伝的形質がアルビノである請求項33記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項35】 鳥類がニワトリ又はウズラである請求項27～34のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類の作製法。

【請求項36】 VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能消失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させ、導入遺伝子を有するG。トランスジェニックキメラ鳥類を得、更に成長させ、交配させることから得られるトランスジェニック鳥類。

【請求項37】 G。トランスジェニックキメラ鳥類の導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が、10%以上である請求項36記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項38】 トランスジェニック鳥類が導入遺伝子を複数コピー有するトランスジェニック鳥類である請求項36又は37記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項39】 複製能消失型レトロウイルスベクターがモロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルスに由来するベクターである請求項36～38のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項40】 導入遺伝子がレトロウイルスに由来しない遺伝子配列を有する導入遺伝子である請求項36～39のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項41】 レトロウイルスに由来しない遺伝子配列がネオマイシン耐性遺伝子配列又はグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子配列である請求項40記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項42】 親鳥類とは異なる遺伝的形質を有する請求項36～41のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項43】 親鳥類とは異なる遺伝的形質がアルビノである請求項42記載のトランスジェニック鳥類。

【請求項44】 鳥類がニワトリ又はウズラである請求項36～43のいずれか1項記載のトランスジェニック鳥類。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、目的とする遺伝子又は遺伝子配列を極めて高い効率で子孫へ伝播するG。トランスジェニックキメラ鳥類及びそれらの作製法に関する。本発明は、目的とする遺伝子又は遺伝子配列を極めて高い効率で生殖細胞に有するG。トランスジェニックキメラ鳥類及びそれらの作製法に関する。また、本発明は目的とする遺伝子又は遺伝子配列を体細胞及び生殖細胞に有するトランスジェニック鳥類とその子孫及びそれらの作製法に関する。更に、本発明は目的とする遺伝子又は遺伝子配列を体細胞及び生殖細胞に従来よりも多くのコピー数で有するトランスジェニック鳥類とその子孫及びそれらの作製法を提供する。更に本発明は安全性の高いG。トランスジェニックキメラ鳥類、トランスジェニック鳥類及びその子孫とそれらの作製法を提供する。更に、本発明は親鳥類とは異なる遺伝的形質を付与されたトランスジェニック鳥類及びそれらの作製法を提供する。更に、本発明は機能が未知の遺伝子を鳥類に導入し、その遺伝子の機能又は遺伝子にコードされているタンパク質の機能を解明するためのトランスジェニック鳥類及びそれらの作製法を提供する。

【0002】

【従来の技術】 トランスジェニック動物は、導入した遺伝子の機能や発生段階での役割を研究する上で重要である。また、新しい形質を動物に付与し、例えば各種動物の品種改良又はタンパク質性医薬品の生産など産業的にも重要である。特にトランスジェニック動物の組織や器官において有用物質を生産する「動物工場」というアイデアは、大量のタンパク質性有用物質を生産することができる画期的方法として期待されている。

【0003】 今までに、山羊、ヒツジ、ブタ又は牛などのトランスジェニック動物の乳汁中に有用物質を分泌生産させる研究が行われ、実際に乳腺特異的プロモーターを用いα1-アンチトリプシン、血液凝固因子又は抗体などの有用物質の乳汁での生産が報告されている。しかし、大型哺乳類は成長速度が遅いこと、飼育コストが高いこと、比較的大きな飼育スペースが必要なこと、また、ある種の動物では有用物質の工業的生産に必要な個体数を確保するために非常に長い期間がかかることなどの問題点がある。このような問題点を克服するために、新しい生産システムとしてのトランスジェニック鳥類の

開発が望まれている。

【0004】家畜として飼育されている鳥類はニワトリをはじめ、アヒル、七面鳥、カモ、ダチョウやウズラなど多種あるが、特にニワトリは食肉用又は採卵用家畜として重要である。

【0005】トランスジェニック鳥類の作製技術は、例えばニワトリを例にすると、品種の改良（例えば成長促進、給餌効率、卵の品質、肉質や肉収量、多産卵、耐病性、羽毛の質など）及び有用物質（例えば抗原、抗体、生理活性ペプチド、治療用タンパク質性医薬品）の卵白、卵黄又はその他の器官での生産への適用が挙げられる。

【0006】鳥類の卵での有用物質の生産は産業上特に重要な課題である。ニワトリなどの長年にわたり改良されてきた家禽は成長が速く、短期間に個体の増殖が可能であり、また、毎日1個の卵を産むために連続的な有用物質の大生産が可能である。

【0007】鶏卵の卵黄は約20%、卵白は約10%のタンパク質を含む。卵白中の主要タンパク質であるオボアルブミン、オボトランスフェリン、オボムコイド、リゾチームはそれぞれ卵白タンパク質の約54%、12%、12%、3、4%を占めており、こうしたものに代替する形で有用物質を生産できれば、極めて高い有用物質の生産性を得ることができる。

【0008】しかしながら、現在まで鳥類の卵で有用物質を生産したという報告はない。また、遺伝子的に修飾された鳥類の改良品種に関する報告例もない。その大きな理由は、導入した遺伝子を効率的に生殖細胞に保有するG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類の作製法が確立されていないことである。

【0009】トランスジェニック鳥類を作製する幾つかの方法が試みられている。Loveら (Love, J. ら (1994) BIO/TECHNOLOGY 12, 60) はニワトリの輸卵管から取り出した卵殻を持たない88個の受精卵の細胞質に、マーカー遺伝子を有する直鎖状のDNAをマイクロインジェクションし、人工的環境下で発生、分化させた。88個の受精卵から7羽が孵化し、このうちの1羽の雄鳥が導入した遺伝子を生殖細胞にモザイク状に有し、その個体と交配した雌鳥が産んだ412羽のうち14羽に導入遺伝子が伝播したと報告している。しかし、この方法は1つの受精卵を得るのに1羽の雌鳥を必要とし、得られた遺伝子導入キメラ・ニワトリの次世代への導入遺伝子の伝播効率は3.4%と低いものであった。

【0010】レトロウイルスベクターを用いたトランスジェニック鳥類の作製も行われた。レトロウイルスベクターを用いた初期のトランスジェニック鳥類の作出は複製可能なレトロウイルスベクターを用いて試験的に行われた (Salter, D. W. ら (1987) Virology 157, 235)。複製可能なレトロウイ

ルスベクターによる受精卵又は胚への遺伝子導入によれば、導入されたベクターが細胞から細胞へと感染するために、調製したレトロウイルスベクターのタイマーに影響されずに遺伝子を導入することが可能であるが、複製可能なレトロウイルスベクター自体の個体への病原性が否定できないこと、導入した複製可能なレトロウイルスベクターから新たな病原性ウイルスが生産される危険性があること、複製可能なレトロウイルスベクターが導入された個体から他の個体に感染する可能性があることなど重要な欠点があり、産業上利用することは困難である。

【0011】従って、トランスジェニック鳥類は複製能欠失型レトロウイルスベクターを用いて作製された。放卵された直後の鳥類の受精卵は、既に卵割が十数回行われ、胚は約60,000の分化した細胞から構成されている。このような胚に複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションした場合、一部の細胞に遺伝子が導入される。この時期の胚（杯盤葉期の胚）には将来生殖細胞に分化する始原生殖細胞となる細胞が存在するが、マイクロインジェクションにより生殖細胞の前駆細胞に遺伝子が導入された胚から孵化した雛は、その生殖細胞の一部に（モザイク状に）導入遺伝子を保有することになる。そのような鳥を、本明細書ではG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類又は単にG<sub>0</sub>と呼ぶ。また、G<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類から非トランスジェニック鳥類との自然交配又は人工授精（以下交配という）によって得た子孫をG<sub>1</sub>鳥類又は単にG<sub>1</sub>と呼ぶ。G<sub>1</sub>鳥類のうち、導入遺伝子を持つ個体をG<sub>1</sub>トランスジェニック鳥類と呼ぶ。G<sub>1</sub>鳥類から非トランスジェニック鳥類との交配によって得た子孫をG<sub>2</sub>鳥類又は単にG<sub>2</sub>と呼ぶ。G<sub>2</sub>鳥類のうち、導入遺伝子を持つ個体をG<sub>2</sub>トランスジェニック鳥類と呼ぶ。また、G<sub>1</sub>トランスジェニック鳥類、G<sub>2</sub>トランスジェニック鳥類、それらから交配により得た子孫のうち導入遺伝子を持つ個体を絶してトランスジェニック鳥類と呼ぶ。雌雄のトランスジェニック鳥類やトランスジェニックキメラ鳥類の交配によって得た子孫のうち、導入遺伝子を持つ個体もトランスジェニック鳥類に含まれる。トランスジェニック鳥類の交配によって得られる子孫は、生殖細胞（精子及び卵子）の生産過程において染色体の分配又は遺伝子の組み換えがなされ、様々な遺伝子型を持つ子孫が生まれる。本明細書中、「トランスジェニック鳥類」の子孫とは、そのような様々な遺伝子型を持つトランスジェニック鳥類を示す。

【0012】Bosselmanら (Bosselman, R. A. ら (1989) Science 243, 533) は、ネオマイシン耐性遺伝子とヘルペス・シンブレックス・ウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子とを有する複製能欠失型レティキュロエンドセリオシス・ウイルス (Reticuloendotheliosis v

*virus*) を、ニワトリの放卵直後の受精卵(計2,58個)の胚にマイクロインジェクションし、孵化した雛のうち760羽に対し導入遺伝子の有無を検討した結果、173羽が陽性であり、そのうちの雄鳥33羽の精子に導入したベクターに由来する遺伝子配列を見いたした。このように選択したG<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ雄鳥4羽と、遺伝子操作をしていない雌鳥とを交配させて得たG<sub>2</sub>。ニワトリへの導入遺伝子の伝播効率を調べた結果、その効率は約2%から8%であったことが報告されている。また、Bosselmanらは、彼らが作製した14羽のG<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ・ニワトリの2羽からは、感染性のあるレティキュロエンドセリオシス・ウイルスの生成を認めており、彼らの使用したベクター・システムが複製能欠失型レトロウイルスベクター・システムであるにせよ、感染性ウイルスを生成する危険性があることを示している。

【0013】Vickら(Vick, L. (1993) Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 251, 179)は、放卵後の胚から始原生殖細胞を分離し、複製能欠失型レトロウイルスベクターで形質転換し、別の胚に移植する方法によりG<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ・ニワトリを得た。彼らの作製したG<sub>1</sub>からG<sub>2</sub>への導入遺伝子の伝播効率は、得られたG<sub>2</sub>個体によって異なるが、2%又は4%と報告している。

【0014】Shuman, R. M. の総説(Shuman, R. M. (1991) Experimentia 47, 897)によると、Leeらは複製能欠失型レトロウイルスを用いて1羽のG<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ・ウズラから1,595羽のG<sub>2</sub>。ウズラを得たが、導入遺伝子が伝播したG<sub>1</sub>。トランスジェニック・ウズラはわずか1羽であったと報告している。

【0015】Thoravalら(Thoraval, P. (1995) Transgenic Res. 4, 369)はネオマイシン耐性遺伝子と大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ(lac Z)遺伝子とを持つ複製能欠失型のエビアン・ロイコシス・ウイルス(Avian leukosis virus)を用いてニワトリ胚を形質転換し、1羽のG<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ・ニワトリを得たが、そのニワトリからのG<sub>1</sub>への導入遺伝子の伝播効率は2.7%であったと報告している。

【0016】以上のように、トランスジェニック鳥類は幾つかのグループによって作出されているが、彼らの方法によって作製されたG<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ鳥類から交配によって得られたG<sub>2</sub>。鳥類への導入遺伝子の伝播効率は低く(10%未満)。そのためには多数のG<sub>1</sub>。鳥類を誕生させ、それについて導入遺伝子の有無の検定を行う必要があり、トランスジェニック鳥類を作製する上で大きな障害となっていた。また、G<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ鳥類からG<sub>1</sub>への遺伝子伝播効率が低いことは、G<sub>1</sub>。トランスジェニック鳥類に伝播導入された

遺伝子のコピー数が少ないことを示しており、有用物質のトランスジェニック鳥類での生産性を制限する要因となっていた。実際、複製能欠失型レトロウイルスベクターを用いて複数の導入遺伝子のコピーを有するG<sub>1</sub>。トランスジェニック鳥類の作製は報告されていない。また、以上のような複製能欠失型レトロウイルスベクターを用いた場合においても、感染性のあるレトロウイルスがトランスジェニック鳥類から生成する危険性を孕んでおり、産業的に応用する上で大きな障害となっていた。

10 【0017】また、鳥類に感染するレトロウイルスベクターを用いて作製されたトランスジェニック鳥類に、同じ又は近縁のレトロウイルスが感染した場合、トランスジェニック鳥類に導入されたプロウイルスが感染性ウイルス粒子としてレスキューされる危険性があり、鳥類に効率良く感染するレトロウイルスに由来するレトロウイルスベクターを用いて作製されたトランスジェニック鳥類は、産業的に応用する上で大きな障害となっていた。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】トランスジェニック鳥類を作製するには、鳥類の生殖細胞のゲノム中に目的とする遺伝子又は遺伝子配列を挿入する必要がある。トランスジェニック哺乳類の作製技術として行われている受精卵核へのDNAマイクロインジェクションは、鳥類の受精卵が極めて大きく、核の位置が不明瞭であり、また受精卵の採取と取り扱いの困難さのために、トランスジェニック鳥類の作製に一般的に適用されていない。実際、トランスジェニック哺乳類の作製で通常用いられている技術によるトランスジェニック鳥類の作製は報告されていない。

30 【0019】鳥類の生殖細胞のゲノム中に目的遺伝子を導入するためには、前述のように放卵直後の胚盤葉期の胚へ複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることが行われている。マイクロインジェクションされた胚を孵化させG<sub>1</sub>。トランスジェニックキメラ鳥類を得、更に成長させ、交配によりG<sub>2</sub>を得る。G<sub>1</sub>からG<sub>2</sub>。鳥類への導入遺伝子の伝播効率は、G<sub>1</sub>。の有する全生殖細胞中のベクター由来の遺伝子配列を有する生殖細胞の割合に依存すると考えられる。今までに報告されたG<sub>1</sub>。からG<sub>2</sub>へのベクター由来の遺伝子の

40 伝播効率は10%未満であり、多数のG<sub>1</sub>。鳥類の導入遺伝子の有無を検定する必要があり、トランスジェニック鳥類を作製する上で大きな障害となっていた。また、今までに得られたG<sub>1</sub>。からG<sub>2</sub>への導入遺伝子の伝播効率が10%未満と低いことは、G<sub>1</sub>。トランスジェニック鳥類に伝播導入された遺伝子のコピー数が少ないことを示しており、有用物質のトランスジェニック鳥類での生産性を制限する要因となっていた。実際、複製能欠失型レトロウイルスベクターを用いて、複数の導入遺伝子を有するG<sub>1</sub>。が得られた例は報告されていない。本発明は、従来よりも高い導入遺伝子の伝播効率を有するG<sub>1</sub>。ト

50

ンスジェニックキメラ鳥類及び複数の導入遺伝子のコピーを有するG<sub>1</sub>トランスジェニック鳥類を得る方法を開示する。

【0020】また、Bosselmanら (Bosselman, R. A. ら(1989) Science 243, 533) が報告しているように、レティキュロエンドセリオシス・ウイルスに由来する複製能欠失型レトロウイルスペクター・システムを用いた場合においては、感染性のある自己複製可能なレトロウイルスがG<sub>1</sub>から検出されたことが報告されている。本発明は、自己複製可能なレトロウイルスが生成しないより安全なG<sub>1</sub>トランスジェニックキメラ鳥類、トランスジェニック鳥類及びその子孫を作製する方法を開示する。

【0021】トランスジェニック鳥類の作製技術は、鳥類の品種改良法として非常に重要である。本発明は、複製能欠失型レトロウイルスペクターを用いた鳥類の品種改良法を開示する。

【0022】鳥類に感染するレトロウイルスペクターを用いて作製されたトランスジェニック鳥類に、同じレトロウイルス又は近縁のレトロウイルスが感染した場合、導入されたプロウイルスが感染性ウイルス粒子としてレスキーされる危険性がある。本発明は人の遺伝子治療にも使用されている極めて安全なウイルスであるモロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルス (MoMLV) に由来するレトロウイルスペクターを鳥類に導入する方法を開示する。

### 【0023】

【課題を解決するための手段】レトロウイルスはRNAウイルスで、感染という過程を通しその宿主細胞に入り込み、逆転写酵素により2本鎖DNAに変換された後、ウイルスのpolに由来するインテグラーゼにより宿主細胞のゲノム中にインテグレート（挿入）される。インテグレートしたレトロウイルスはプロウイルスと呼ばれる。プロウイルスは細胞分裂に伴い娘細胞へと伝えられる。プロウイルスからはレトロウイルスゲノムRNAが転写され、そのレトロウイルスゲノムRNAはパッケージングシグナル配列を有し、プロウイルスが持つ2つの遺伝子 gag、polから生産されるタンパク質群から構成されるウイルス粒子に取り込まれる。レトロウイルスゲノムRNAを含むウイルス粒子は、同じくプロウイルスが持つenv遺伝子から転写、翻訳された膜タンパク質を含む宿主細胞膜に包み込まれ、細胞から放出され感染性のあるレトロウイルスが再生産される。

【0024】このようなレトロウイルスの生活環を利用したレトロウイルスペクターが1980年代から開発されてきた。レトロウイルスペクターは複製可能なレトロウイルスペクターと複製能欠失型レトロウイルスペクターに大別される。

【0025】複製可能なレトロウイルスペクターには、ウイルス粒子の複製に必要な3種の機能的な遺伝子 gag

g、pol、envが含まれている。複製可能なレトロウイルスペクターは、それが導入された動物個体から感染性のウイルス粒子を生産し、他の生物に感染させる危険性があるために、産業上有用なトランスジェニック動物を作製するには適切でない。

【0026】複製能欠失型レトロウイルスペクターは、ウイルス粒子の複製に必要な3種の機能的な遺伝子 (gag、pol、env) のうち、何れか又は全てを持たないか又は機能しない。従って、一度標的細胞に感染した後は、標的細胞は新たな感染性ウイルス粒子を生成しない。近年の複製能欠失型レトロウイルスペクターは、gag、pol、envの全ての遺伝子を欠失している。そのような複製能欠失型レトロウイルスペクターを調製するためには、様々な方法が知られているが、基本的にはベクターコンストラクトと感染性ウイルス粒子の生産に必要なgag、pol、env遺伝子産物を供給するシステム（ヘルバーウィルス又はパッケージング細胞など）が必要である。

【0027】ベクターコンストラクトとは、プロウイルスの構造からgag、pol、envなどの機能的な遺伝子を除き、その代わりに所望の遺伝子又は遺伝子配列を挿入した構造を有するDNAである。また、ベクターコンストラクトはパッケージングシグナル配列を有している。パッケージング細胞はベクターコンストラクトを導入したときに感染可能なウイルス粒子を生産する細胞で、機能的なgag、pol、env遺伝子を発現している。

【0028】複製能欠失型レトロウイルスペクターは、ベクターコンストラクトをパッケージング細胞に導入すればその培養液から回収される。レトロウイルスペクターは、標的細胞に感染及びゲノムへのインテグレーションという過程を通して効率よく外来性遺伝子を導入することができる。この感染の過程は、レトロウイルスペクターの外被タンパク質（エンベロブ・プロテイン）と標的細胞の膜に存在する外被タンパク質のレセプターに依存する。従ってレトロウイルスペクターの外被タンパク質のレセプターが存在しないか又は少ない標的細胞には、レトロウイルスペクターによる遺伝子の導入ができないか又は導入できたとしても効率が悪い。

【0029】例えば、レトロウイルスを代表するMoMLVは、外被タンパク質の違いによってエコトロビック・ウイルス及びアンフォトロビック・ウイルスに分けられる。前者はマウス及びラットの細胞のみに感染するが、ハムスター由来の細胞であるBHK細胞には感染しない。後者はマウス、ラットの他にハムスター、ヒト、サル等の細胞に感染する。

【0030】MoMLVに由来するレトロウイルスペクターは1980年代から研究され、哺乳類の細胞に安定に遺伝子を導入することを可能にした。MoMLVに由来するレトロウイルスペクターは人の遺伝子治療に用い

られている極めて安全性の高いベクターである。しかし、MoMLVに由来するレトロウイルスベクターに代表されるレトロウイルスベクターの特徴として、標的細胞への感染効率（遺伝子の導入効率）が標的細胞の種類によって大きく異なり、非常に感染、導入しにくい標的細胞があることが挙げられる。

【0031】この種のレトロウイルスベクターのもう一つの特徴として、ウイルスのエンベロップが脆弱であり、超遠心などの濃縮操作によってウイルスのタイマーが上がらないことがある。逆に、超遠心などの濃縮操作によりウイルスタイマーが低下する場合がある。

【0032】G<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類を得るには、鳥類の胚にレトロウイルスベクターをマイクロインジェクションする過程が含まれるが、胚へのマイクロインジェクション可能な液量は使用する鳥類の胚の大きさに依存する。実際、胚盤葉期の胚の場合、ウズラでは数マイクロリットル、ニワトリでは十数マイクロリットルが限界である。

【0033】以上のように、レトロウイルスベクターによって導入遺伝子の高い伝播効率を有するG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類を生産するためには、鳥類の胚に含まれる始原生殖細胞やその前駆細胞の使用するレトロウイルスベクターへの感染感受性の有無、使用するレトロウイルスベクター・ストックのタイマー及び胚へマイクロインジェクションする液量が関連すると考えられた。

【0034】レトロウイルスベクターの感染宿主域を変える有力な手段は、そのレトロウイルスベクターの宿主域を決定している外被タンパク質を、他のウイルスに由来する外被タンパク質と置換したレトロウイルスベクター（このようなレトロウイルスベクターをシュードタイプのレトロウイルスベクターという）を用いることである。Emiら(Emi, N.ら(1991) Virology, 65, 1202)は、MoMLVの外被タンパク質の代わりに水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus: VSV)の外被タンパク質であるVSV-Gタンパク質を持つシュードタイプのレトロウイルスベクターを作製し、それが本来MoMLVに対し感染性の低いBHK細胞に感染、導入されることを示した。その後、Burnsら(Burns, J. C. ら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8033)により改良され、VSV-Gタンパク質を持つシュードタイプのレトロウイルスベクターが超遠心操作により濃縮されることが示された。同様に、センダイ・ウイルス(Sendai virus)のヘマグルチニン-ノイラミニダーゼや融合タンパク質(SV-F)を外被タンパク質として持つシュードタイプのMoMLVの感染宿主域が、それぞれ広くなったり、逆に狭くなることが報告されている(Spiegel, M. ら(1998) J. Vi-

o 1., 72, 5296)。

【0035】VSVは、殆どの哺乳類及び鳥類の培養細胞に感染することが知られている。また、爬虫類、魚類、蚊やショウジョウバエなどの昆虫などの培養細胞で感染、増殖することが知られている。

【0036】本発明者らは、VSV-G外被タンパク質を有するシュードタイプのレトロウイルスベクター（複製能欠失型ウイルス）を鳥類の胚にマイクロインジェクションした場合、生殖細胞の前駆細胞に感染、導入されるか否かの検討を行った。その結果、得られたG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類が、導入した遺伝子をこれまでになく極めて高い効率でG<sub>1</sub>へ伝播することを発見し、本発明に至った。

【0037】更に、本発明者らは、本発明による極めて高いG<sub>1</sub>への導入遺伝子の伝播効率を有しているG<sub>0</sub>が、G<sub>1</sub>トランスジェニック鳥類に多数の導入遺伝子のコピーを伝播する能力を有することを発見した。この発見は、有用物質のトランスジェニック鳥類での生産性を高める上で重要な知見である。

【0038】本発明によりG<sub>1</sub>への極めて高い遺伝子伝播効率を有しているG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類が得られることは、機能が未知の遺伝子を鳥類に高効率に導入し、その遺伝子の機能又はその遺伝子にコードされているタンパク質の機能を解明するためのトランスジェニック鳥類を作製する上で、極めて優れた方法を提供するものである。

【0039】また、本発明においてVSV-G外被タンパク質を有するシュードタイプのレトロウイルスベクターを用いて作製したG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類は、感染性の粒子を全く放出しないために、G<sub>1</sub>や他の鳥類が感染性ウイルス粒子に汚染されることはなく、安全なトランスジェニック鳥類の作製法といえる。

【0040】更に、本発明で初めて示したMoMLVを基本骨格として有するレトロウイルスベクターにより作製されたトランスジェニック鳥類は、(鳥類のレトロウイルスを基本骨格として持つベクターと異なり、)鳥類に感染可能なレトロウイルスが導入した遺伝子を感染性ウイルス粒子としてレスキューシ、その感染性ウイルス粒子による他の鳥類への感染、伝播をする危険性が極めて少なく、より安全なトランスジェニック鳥類の作製法である。

【0041】本発明者らは、VSV-G外被タンパク質を有するシュードタイプのレトロウイルスベクターを用いて作製したG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラ鳥類が、生殖細胞系列のゲノムに多数の導入遺伝子のコピーを有することを発見した。導入遺伝子の挿入部位は一見ランダムな挿入部位である。導入遺伝子の挿入部位が鳥類の機能的な遺伝子配列中である場合、G<sub>1</sub>トランスジェニックキメラ鳥類からは、遺伝子の機能が修飾されたG<sub>1</sub>トランスジェニック鳥類が効率的に誕生する可能性が考え

られた。例えば、羽毛の色調が変化したG<sub>1</sub>トランシジェニック鳥類が効率的に誕生すると考えられた。本発明者は、遺伝子の機能が修飾された鳥類やノックアウト遺伝子を有する鳥類を効率的に生産、育種することが可能であることを、VSV-G外被タンパク質を有するショードタイプのレトロウイルスベクターを用いて作製したG<sub>1</sub>トランシジェニックキメラ鳥類から、交配によりアルビノ形質を示すG<sub>2</sub>トランシジェニック鳥類を得ることに成功し、本発明に至った。

【0042】本発明は、複製能欠失型レトロウイルスベクターによって遺伝子導入されたG<sub>1</sub>トランシジェニックキメラ鳥類であって、導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が10%以上であるG<sub>2</sub>トランシジェニックキメラ鳥類である。以下に本発明を詳述する。

#### 【発明の実施の形態】

【0043】本発明で用いられる複製能欠失型レトロウイルスベクターとしては、複製能が欠失しているものであれば特に限定されず、例えば、ウイルス粒子の複製に必要な3種の機能的な遺伝子(gag、pol、env)のうち、何れか又は全てを持たないか又は機能しないものを挙げることができる。このようなgag、pol、envのうち、何れか又は全てを持たないか又は機能しないレトロウイルスベクターは、一度標的細胞に感染した後は、新たな感染性ウイルス粒子を生成することができない。

【0044】なお、gagは、ウイルス粒子の構造タンパク質であるマトリックス、キャップシド、ヌクレオキャップシドを、polは酵素である逆転写酵素、インテグラーゼ、プロテアーゼを、そしてenvは外被タンパク質をコードしている。

【0045】本発明で用いられる複製能欠失型レトロウイルスベクターとしては、例えば、モロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルス(MoMLV)、ラウス・ザルコマ・ウイルス(RSV)、マウス・ママリー・チュモア・ウイルス(MMTV)等に由来するものを挙げができるが、なかでも、MoMLVに由来するものが好ましい。

【0046】上記MoMLVは、多くのレトロウイルスベクター開発の基礎となったウイルスであり、約8キロベースの1本鎖RNAをゲノムとして有している。その構造は真核生物のmRNAの構造と類似しており、5'末端にキャップ構造、3'末端にはポリ(A)テイルを持っている。5'端にはR-U5、3'端にはU3-Rという複製、転写に必要な領域が存在する。これらの両端の間にはgag、pol、envの翻訳領域がある。U5とgagの間にはウイルスRNAゲノムがウイルス粒子に取り込まれるために必要なバッケージングシグナル配列がある。MoMLVは、その感染により細胞に侵入する。侵入したウイルスゲノムは逆転写酵素により2本鎖DNAに変換され、宿主細胞のゲノムに挿入され

る。この挿入されたウイルス由來のDNAをプロウイルスというが、プロウイルスからは宿主細胞のRNAポリメラーゼにより再びウイルスゲノムRNAが合成される。また、gag、pol、envから感染性のあるMoMLV粒子の生産に必要な全てのタンパク質が生産され、細胞からMoMLVが芽生により放出される。

【0047】一般に、複製能欠失型レトロウイルスベクターを調製するためには、様々な方法(Retroviruses, Coffin, J. M., Hughes,

- 10 S. H. and Vermus, H. E. eds. (1997) Cold Spring Harbor Laboratory Press) が知られているが、基本的にはベクターコンストラクトと感染性ウイルス粒子の生産に必要なgag、pol、env遺伝子産物とを供給するシステム(ヘルバーウィルス又はバッケージング細胞など)が必要である。
- 20 【0048】上記のgag、pol、env遺伝子産物を供給するシステム(ヘルバーウィルス又はバッケージング細胞など)としては、通常、Retrovirus es, Coffin, J. M., Hughes, S. H. and Vermus, H. E. eds. ((1997) Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載されているシステム等が用いられ、なかでも、gag、pol、env遺伝子産物を構成的に生産する細胞(バッケージング細胞)が多用される。gag、pol、envの遺伝子配列がレトロウイルスと同様な構造でバッケージング細胞中に存在すると、バッケージング細胞に導入したベクターコンストラクトとの間で組み換えを起こし、複製能のある感染性ウイルス粒子(Replication-competent retrovirus)が生成する可能性がある。従って、近年のバッケージング細胞としては、gag-pol及びenvの2種類の発現ベクターによって形質転換し、gag-pol及びenvが構成的又は一過性に発現する細胞が用いられる。

【0049】上記ベクターコンストラクトをバッケージング細胞に導入する方法としては特に限定されず、例えば、リボフェクション法、リン酸カルシウム法、電気導入法などを挙げができる。

- 40 【0050】本発明で用いられる複製能欠失型レトロウイルスベクターとしては、VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能欠失型レトロウイルスベクターが好適に用いられる。複製能欠失型レトロウイルスベクターの外被タンパク質を、VSV-Gタンパク質と置換することにより、鳥類に感染能がないウイルスに由来するものであっても、鳥類を宿主とすることができます。

【0051】上記VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能欠失型レトロウイルスベクターを調製する方法としては特に限定されず、例えば、上述のenvを発現するバッケージング細胞の代わりにVSV-Gタンパク

質を発現するパッケージング細胞を用い、このようなパッケージング細胞にベクターコンストラクトを導入し、パッケージング細胞を培養することにより、培養液中から回収することができる。

【0052】上記VSV-Gタンパク質を発現するパッケージング細胞としては、*gag-pol*を構成的に発現するパッケージング細胞を、VSV-Gタンパク質の発現ベクターによりトランスフェクションしたものが好適に用いられる。*gag-pol*を構成的に発現するパッケージング細胞を、VSV-Gタンパク質の発現ベクターによりトランスフェクションする際に、併せて、ベクターコンストラクトによりコトランスフェクションしてもよい(Yee, J. K. ら(1994) *Methods Cell Biol.*, 43, Pt A, 99)。また、*gag-pol*を構成的に発現し、ある条件下でVSV-Gタンパク質を大量に誘導発現することが可能なパッケージング細胞が用いられてもよい(Arai, T. ら(1998) *J. Virol.*, 72, 1115; 米国特許5, 739, 018)。

【0053】上記VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能欠失型レトロウイルスベクターは、また、複製能欠失型プロウイルスを有し、且つ*gag-pol*を構成的に発現するパッケージング細胞をVSV-Gタンパク質の発現ベクターによりトランスフェクションすることにより調製されてもよく、無細胞系により調製されてもよい(Abe, A. ら(1998) *J. Virol.*, 72, 6356)。

【0054】VSV-Gタンパク質は細胞に毒性を示すために、VSV-Gタンパク質を安定且つ大量に構成的発現する細胞は得られない。従って、*gag-pol*遺伝子を構成的に発現するパッケージング細胞に、VSV-G遺伝子を含むベクターコンストラクトを導入することにより、VSV-Gタンパク質を外被タンパク質として持つレトロウイルスが回収される(Emi, N. ら(1991) *Virology*, 65, 1202; Burns, J. C. ら(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8033)。しかし、そのようにして作製したショードタイプのレトロウイルスベクターは不要なVSV-G遺伝子を含むために、トランスジェニック鳥類を作製する上では適切でない。

【0055】本発明において鳥類に導入される導入遺伝子としては特に限定されないが、レトロウイルスに由来しない遺伝子であるのが好ましい。上記レトロウイルスに由来しない遺伝子としては特に限定されず、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子又はグリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子などを挙げることができるが、有用タンパク質をコードする遺伝子などが用いられてもよい。

【0056】上記導入遺伝子は、ベクターコンストラク

トのプロウイルスの5'端及び3'端の間に挿入される。これらの導入遺伝子を、トランスジェニック鳥類で発現させるためには、必要に応じそれらの遺伝子は転写をコントロールするプロモーター配列を用いてもよい。上記プロモーター配列としては組織特異的な発現をコントロールするプロモーター配列、組織に於いて構成的な発現をコントロールするプロモーター配列又は誘導可能なプロモーター配列が利用できる。本発明のG。トランスジェニックキメラ鳥類としては特に限定されず、例えば、ニワトリ、アヒル、七面鳥、カモ、ダチョウ、ウズラなどの家畜として飼育されている有用鳥類を挙げることができる。なかでも、ニワトリやウズラが好ましい。ニワトリやウズラは、入手が容易である。

【0057】本発明のG。トランスジェニックキメラ鳥類を作製する方法としては特に限定されないが、例えば、VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能欠失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させる方法により作製することができる。

【0058】上記VSV-Gタンパク質を含む膜を有する複製能欠失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入する方法としては特に限定されず、例えば、放卵後の胚に複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションする方法などを挙げることができる。

【0059】上記のマイクロインジェクション法としては、従来行われている方法が適用できる。すなわち、Bosselmanら(Bosselman, R. A. ら(1989) *Science* 243, 533)、Vickら(Vick, L. ら(1993) *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 251, 179)が彼らの文献で示した方法又は本発明者らが本発明の実施例で示した方法などが適用できる。上記のG。トランスジェニックキメラ鳥類を作製する方法もまた、本発明の1つである。

【0060】上記複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションをした胚を培養し、G。トランスジェニックキメラ鳥類を孵化させるには、本発明者が開発した人工卵殻を用いた方法(Kamihira, M. ら(1998) *Develop. Growth Differ.*, 40, 449)、Bosselmanら(Bosselman, R. A. ら(1989) *Science* 243, 533)又はVickら(Vick, L. ら(1993) *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 251, 179)が彼らの文献で示した方法が適用できる。

【0061】本発明のG。トランスジェニックキメラ鳥類を成体まで成長させ、非トランスジェニック鳥類と交配を行うことにより、G。トランスジェニックキメラ鳥類に導入した遺伝子をG<sub>1</sub>鳥類へ伝播することができる。遺伝子伝播の成否は、得られたG<sub>1</sub>の血液又は各組織などからDNAを抽出し、PCR法又はハイブリダイ

ゼーション法などにより導入遺伝子の有無を検定することによって調べられる。

【0062】本発明のG。トランスジェニックキメラ鳥類は、導入遺伝子のG<sub>1</sub>への伝播効率が10%以上であることを特徴とする。遺伝子伝播効率は、G。トランスジェニックキメラ鳥類から交配により得られた全G<sub>1</sub>鳥類に対する導入遺伝子を有するG<sub>1</sub>トランスジェニック鳥類の割合(%)で示される。好ましくは、20~90%である。

【0063】M<sub>o</sub>MLVに由来する複製能欠失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させ、導入遺伝子を有するG<sub>1</sub>トランスジェニックキメラ鳥類を得、更に成長させ、交配させることからなるトランスジェニック鳥類及びその作製法、並びに、VS V-Gタンパク質を含む膜を有する複製能欠失型レトロウイルスベクターを鳥類の胚に導入し、その胚を孵化させ、導入遺伝子を有するG<sub>1</sub>トランスジェニックキメラ鳥類を得、更に成長させ、交配させることからなるトランスジェニック鳥類及びその作製法もまた、本発明の1つである。なお、本明細書において、トランスジェニック鳥類とは、その子孫も含むものである。

【0064】本発明のトランスジェニック鳥類は、全ての生殖細胞及び体細胞に導入遺伝子を有しており、該トランスジェニック鳥類が有する導入遺伝子は交配によって得られる子孫へ伝播される。

【0065】本発明のトランスジェニック鳥類は、導入遺伝子を複数コピー有することが好ましい。本発明のトランスジェニック鳥類が有する導入遺伝子のコピー数は、定量的なPCR法や該鳥類のDNAを適切な制限酵素で切断後、サザンプロットにより確認できる。本発明のトランスジェニック鳥類が有する導入遺伝子のコピー数は、好ましくは2以上である。

【0066】本発明のトランスジェニック鳥類での導入遺伝子の転写や発現は、トランスジェニック鳥類の各組織からmRNAを抽出し、RT-PCR法で確認できる。また、抗原抗体反応などで確認される。

【0067】G<sub>1</sub>トランスジェニックキメラ鳥類から交配により得られた子孫の遺伝形質を確認するには、目的とする形質(例えば子孫の羽毛の色調、成長速度、給餌効率、子孫の性の割合、肉質、産卵数又は寿命など)を調べることにより確認することができる。

【0068】本発明のトランスジェニック鳥類は、必要に応じて親鳥類とは異なる遺伝的形質を有していてよい。上記親鳥類とは異なる遺伝的形質としては特に限定されず、例えば、アルビノを挙げることができる。アルビノはZ染色体上のチロシナーゼ遺伝子が破壊された場合に起る形質であるので、アルビノの発生は導入遺伝子伝播率が高いことを表す。

【0069】本発明によれば、所望の形質を持つ鳥類を育種することができるので、本発明は、遺伝子の機能が

修飾された鳥類やノックアウト遺伝子を有する鳥類を効率的に生産、育種するために用いることができる。発明はまた、有用物質を生産するために用いることもできる。

#### 【0070】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではなく、実施例において用いられた鳥類の胚に含まれる始原生殖細胞やその前駆細胞の複製能欠失型レトロウイルスベクターに対する感染感受性、ウイルス溶液のタイマー及び胚へマイクロインジェクションする液量などにより何ら限定されるものではない。

【0071】(実施例1) 複製能欠失型レトロウイルスベクターの調製

複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクトpLGRNは、以下のように作製した。すなわち、プラスミドpGREEN LANTERN(ギブコBRL社製)からグリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子を制限酵素Not Iで切り出し、pZe o SV2(+) (インビトロジェン社製)のNot Iサイトへ挿入し、プラスミドpZe o - GFPを作製した。次に、pZe o - GFPからGFP遺伝子を制限酵素Eco RV及びXba Iによって更に切り出し、pLXRN(クロンティック社製)のHpa I、Xba Iサイトへ挿入し、ベクターコンストラクトpLGRNを作製した。このように作製した複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクトpLGRNの構造を図1に示した。

【0072】(実施例2) コトランスフェクションによる複製能欠失型レトロウイルスベクターの生産

トランスフェクションの前日に、ウイルスパッケージング細胞であるGP293細胞(クロンティック社製)を、直径100mmのディッシュに5×10<sup>6</sup>細胞植え培養した。24時間後、GP293細胞がおよそ80%コンフルエントに増殖していることを確認し、新鮮なDME M(ダルベッコズ・モディファイド・イーグルズ・メディア)培地に交換した。VS V-G発現ベクターポVSV-G(クロンティック社製)8μgとpLGRN8μgとをリポフェクション法によりGP293細胞に導入した。48時間後、ウイルス粒子を含む培養上清を回収し、0.45μm酢酸セルロースフィルターを通して夾雑物を除いた。得られたVSV-G外被タンパク質を有するウイルス溶液にポリブレンを10μg/mlとなるように加えた。このようにして調製したウイルス溶液のタイマーは約10<sup>5</sup>cfu(コロニー・フォーミング・ユニット)であった。ウイルスタイマーの測定は以下に示すように行った。アッセイする前日にNIH3T3細胞(アメリカン・タイプカルチャー・コレクション)を直径35mmのディッシュに7×10<sup>4</sup>細胞植え培養した(4ディッシュ)。10<sup>2</sup>から10<sup>6</sup>倍に希釈

したウイルス溶液を各ディッシュに1ml加え、2日後に蛍光顕微鏡観察によりGFPを発現している細胞の割合を測定しタイマーを決定した。

$$\text{例: 細胞数 (10^6) \times 希釈率 (10^4) \times 発現率} \\ (0.8) = 8 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$$

【0073】(実施例3)複製能欠失型レトロウイルスベクター生産用の安定形質転換株の樹立

実施例2と同様に、GP293細胞を準備した。GP293細胞が増殖したディッシュから培養液を除き、実施例2で調製したVSV-G外被タンパク質を有するウイルス溶液を10ml加えた。更に2日間培養した後、ウイルス感染処理したGP293細胞を600μg/mlのG418を含む培養液に植え継ぎ、G418耐性な安定形質転換株を取得した。

【0074】(実施例4)高タイマーの複製能欠失型レトロウイルスベクターの調製

直径100mmのディッシュに実施例3で得たG418耐性な安定形質転換株を約80%コンフルエントとなるように培養し、16μgのpVSV-Gをリポフェクション法により導入した。48時間後、ウイルス粒子を含む培養上清12mlを回収した。本培養上清に含まれるウイルスのタイマーは約10<sup>7</sup>cfu/mlであった。

【0075】(実施例5)複製能欠失型レトロウイルスベクターの濃縮

実施例4で調製した複製能欠失型レトロウイルスベクターを含む培養上清を50,000×g、4°Cで1.5時間遠心を行い沈殿させた。上清を除き、ウイルス粒子を含む沈殿物に50μlの50mM Tris-HCl

(pH7.8)、130mM NaCl、1mM EDTA溶液を加えた。4°Cで一晩放置後、よく懸濁してウイルス溶液を回収した。このようにして調製したウイルスのタイマーは約10<sup>9</sup>cfu/mlであった。

【0076】(実施例6)ウズラ胚へのウイルス溶液のマイクロインジェクション

WE系統のウズラ受精卵(日本生物化学研究所より入手)を使用した。受精卵の卵殻を70%エタノールで消毒し、鋭端部を直径2cmの円形にダイヤモンドカッタ\*

\*-(MINOMO7C710、ミニター社製)で切り取り、胚を露出させた。胚盤葉を実体顕微鏡で観察しながら、ガラス管(CD-1、オリンパス社製)をマイクロピペット製作機(PC-10、オリンパス社製)で加工し、外径約20μmになるように先端を折って作製した針を刺し、マイクロインジェクター(Transjector 5246、エッペンドルフ社製)を用いて胚盤下腔の中央に、実施例5で調製したウイルス溶液約2μlを微量注入した。

10 【0077】(実施例7)ウズラ胚培養

実施例6でウイルス粒子をマイクロインジェクションしたウズラ受精卵を卵殻の切り口まで卵白で満たした後、卵白を糊として、テフロン膜(ミリラップ、ミリポア社製)とボリ塩化ビニリデンラップ(サンランラップ、旭化成社製)とで蓋をし、自動転卵装置が内蔵された孵卵器(P-008型、昭和フランキ研究所製)内で、約48時間、37.9°C、湿度65%で15分毎に90度転卵しながら孵卵した。正常に発生が進行していることを確認したのち、ニワトリのSサイズの卵殻の鋭端部に直径

20 4cmの穴を開けたものにウイルス導入胚を移した。胚を上にして空気につけるようにし、濃度50mg/mlで卵白に懸濁した乳酸カルシウム溶液を0.5ml添加後、卵白を糊としてラップで密閉した。再度孵卵器に入れ、37.9°C、湿度65%で1時間毎に30度転卵しながら13日間培養した。転卵を止め静置状態にし、胚が肺呼吸に移行したら(ハシウチ)ラップに針で小さな穴を開け、呼吸を助けた。漿尿膜の血が引いたら培養器から離を出し、孵化させた。

【0078】(実施例8)遺伝子導入ウズラ胚の孵化率  
30 ウィルス導入胚培養操作を3回(各回40-49胚)行って、複製能欠失型レトロウイルスベクターによる遺伝子導入処理した胚を実施例7で示した方法により孵化させた。3回の実験では13~39%の孵化率で遺伝子導入ウズラ胚を孵化させることができた。表1に遺伝子導入ウズラ胚の孵化率を示した。

【0079】

【表1】

回	処理した胚数	3日目での生存率	孵化率
1	40	36(90%)	12(30%)
2	49	44(90%)	19(39%)
3	45	29(64%)	6(13%)

【0080】(実施例9)孵化したウズラの導入遺伝子の検定

実施例8によって孵化したそれぞれのウズラの漿尿膜を採取し、Mag Extractor-genome-(東洋紡社製)を用いてゲノムDNAを抽出した。遺伝子導入に用いた複製能欠失型レトロウイルスベクターに含まれるネオマイシン耐性遺伝子の一部368bpをP

CR法により増幅し導入遺伝子の有無を検定した。検定を行った13羽のウズラ全ての漿尿膜に関してネオマイシン耐性遺伝子の増幅が確認できた(図2)。このことは、検定した13羽のウズラが、全てG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラウズラであることを示している。

【0081】(実施例10)G<sub>0</sub>トランスジェニックキメラウズラの子孫への導入遺伝子の伝播効率

21

実施例8によって孵化したG<sub>1</sub>トランスジェニックキメラウズラのうちの6羽と遺伝子操作をしていないウズラとをそれぞれ交配させ、複数のG<sub>1</sub>ウズラを得た。実施例9と同様にして、孵化したG<sub>1</sub>ウズラの漿尿膜からゲノムDNAを調製し、PCR法によって遺伝子の伝播を\*

22

\*確認した。表2に示すように平均82%の効率でG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラを得た。また、G<sub>1</sub>(#6)では88%のG<sub>1</sub>への導入遺伝子の伝播効率を示した。

【0082】

【表2】

G <sub>1</sub>		G <sub>1</sub> 検定数	伝播数	効率(%)
#	雌雄			
1	♀	23	20	87
2	♀	18	15	83
3	♀	21	16	76
4	♂	16	13	81
5	♂	20	15	75
6	♀	17	15	88
合計(平均)		115	94	82

【0083】(実施例11) G<sub>1</sub>トランスジェニックウズラ各組織での導入遺伝子の存在  
漿尿膜で導入遺伝子の存在が確認できたG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラについて、各組織(肝臓、心臓、生殖巣、脾臓、脳、表皮)から、ゲノムDNAを抽出し、PCR法により全身で導入遺伝子が存在するか調べた。導入した複製能欠失型レトロウイルスベクター上にあるネオマイシン耐性遺伝子、GFP遺伝子がともに各臓器のDNAから増幅され、導入した複製能欠失型レトロウイルスベクターが全身の細胞に存在することが確認できた(図3)。

【0084】(実施例12) 導入遺伝子のコピー数の測定

6羽のG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラの血液からゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAをそれぞれ制限酵素XbaI、KpnIで切断し、0.8%アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後、DNAをナイロンメンブレン(Hybond N+、アマシャムファルマシア社製)にアルカリトランスファーした。ランダムプライマー法によって放射性同位体ラベルをしたGFP遺伝子のプローブ、ネオマイシン耐性遺伝子のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。XbaI切断により遺伝子のコピー数が分かり、KpnI切断により導入遺伝子の欠失や組み換えが起こっていないことが確認された。6羽のG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラについての解析結果を図4に示した。ゲノムあたり3コピーの導入遺伝子を持つ固体が1羽、2コピーが3羽、1コピー持つ固体が1羽であった。

【0085】(実施例13) G<sub>1</sub>トランスジェニックウズラ及びG<sub>2</sub>トランスジェニックウズラでの導入遺伝子の発現

G<sub>1</sub>トランスジェニックウズラを遺伝子操作をしていないウズラと交配させG<sub>2</sub>トランスジェニックウズラを得た。G<sub>1</sub>トランスジェニックウズラ及びG<sub>2</sub>トランスジ

エニックウズラの各組織(心臓、脳、肝臓、筋肉、腎臓、脾臓、生殖巣)からmRNAを、mRNA isolation Kit(ロッシュ社製)を用いて精製した。RT-PCR法(Ready to Go RT-PCR beads、アマシャムファルマシア社製)により、ネオマイシン耐性遺伝子(増幅領域368bp)、GFP遺伝子(増幅領域311bp)の発現を調べた。コントロールとしてGAPDH遺伝子(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子；増幅領域589bp)のRT-PCRも行った。ネオマイシン耐性遺伝子は心臓、筋肉において比較的強い発現が確認された。また、肝臓、腎臓においても若干の発現が確認された。GFPにおいては、RT-PCRでは発現が検出されなかった。G<sub>2</sub>トランスジェニックウズラにおいてもネオマイシン耐性遺伝子は心臓と筋肉で強い発現がみられ、発現パターンはG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラからG<sub>2</sub>トランスジェニックウズラに伝播された。結果を図5に示した。GFPの発現が観察されなかったことは、MoMLVのLTR(ロング・ターミナル・リピート)のプロモーター活性が鳥類では機能しないことを意味しており、本発明に使用した複製能欠失型レトロウイルスベクターが、トランスジェニック鳥類を作製する上で、極めて安全であることを示唆している。

【0086】(実施例14) アルビノ形質を有するトランスジェニック鳥類の作製

実施例10で示したG<sub>1</sub>トランスジェニックキメラウズラ(#4)由来の16羽のG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラのうち、2羽がアルビノであった。アルビノはZ染色体上のチロシナーゼ遺伝子が破壊された場合に起こる形質であり、上記複製能欠失型レトロウイルスベクターにより当該遺伝子の破壊又は機能の欠失が起こったことが示唆された。

【0087】(実施例15) ニワトリに導入する複製能欠失型レトロウイルスベクターの調製

直径100mmのディッシュに実施例3で得たG418耐性な安定形質転換株を約80%コンフルエントとなるように培養し、 $16\mu\text{g}$ のpVSV-Gをリポフェクション法により導入した。48時間後ウイルス粒子を含む培養上清12mlを回収した。本培養上清を50,000×g、4°Cで1.5時間遠心を行い沈殿させた。上清を除き、ウイルス粒子を含む沈殿物に $50\mu\text{l}$ の50mM Tris-HCl(pH7.8)、130mM NaCl、1mM EDTA溶液を加えた。4°Cで一晩放置後、よく懸濁してウイルス溶液を回収した。このようにして調製したウイルス溶液のタイマーは約1~ $2\times 10^8\text{ c.f.u./ml}$ であった。

【0088】(実施例16)ニワトリ胚へのウイルス溶液のマイクロインジェクション

ニワトリ受精卵(日本生物化学研究所より入手)を使用した。受精卵の卵殻を70%エタノールで消毒し、鋭端部を直径3.5cmの円形にダイヤモンドカッター(MINOMO 7C710、ミニター社製)で切り取り、胚を露出させた。胚盤葉を实体顕微鏡で観察しながら、ガラス管(CD-1、オリンパス社製)をマイクロビット製作機(PC-10、オリンパス社製)で加工し、外径約20μmになるように先端を折って作製した針を刺し、マイクロインジェクター(Transjector 5246、エッペンドルフ社製)を用いて胚盤下腔の中央に、実施例15で調製したウイルス溶液約2μlを微量注入した。

【0089】(実施例17)ニワトリ胚培養

実施例16でウイルス粒子をマイクロインジェクションしたニワトリ受精卵を卵殻の切り口まで卵白で満たした後、卵白を糊として、テフロン(登録商標)膜(ミリラップ、ミリポア社製)とポリ塩化ビニリデンラップ(サンラップ、旭化成社製)とで蓋をし、自動転卵装置が内蔵された孵卵器(P-008型、昭和フランキ研究所製)内で、約48時間、37.9°C、湿度65%で15分毎に90度転卵しながら孵卵した。正常に発生が進行していることを確認したのち、有精卵よりも大きなニワトリ二黄卵の鋭端部に直径4.5cmの穴を開けたものにウイルス導入胚を移した。胚を上にして空気に触れるようにし、濃度50mg/mlで卵白に懸濁した乳酸カルシウム溶液を0.5ml添加後、卵白を糊としてラップで密閉した。再度孵卵器に入れ、37.9°C、湿度65%で1時間毎に30度転卵しながら15日間培養した。転卵を止め静置状態にし、胚が肺呼吸に移行したら(ハシウチ)ラップに針で小さな穴を開け、呼吸を助けた。漿尿膜の血が引いたら培養器から雛を出し、孵化させた。

【0090】(実施例18)遺伝子導入ニワトリ胚の孵化率

ウイルス導入胚培養操作を行って、複製能欠失型レトロウイルスベクターによる遺伝子導入処理した胚を実施例

17で示した方法により孵化させた。今回の実験では35の胚培養により6羽(17%の孵化率)のニワトリの雛を孵化させることができた。

【0091】(実施例19)孵化したニワトリの導入遺伝子の検定

実施例18によって孵化した6羽のニワトリ雛の漿尿膜を採取し、Mag Extractor-genome-(東洋紡)を用いてゲノムDNAを抽出した。遺伝子導入に用いた複製能欠失型レトロウイルスベクターに含まれるネオマイシン耐性遺伝子の一部368bpを、PCR法により増幅し導入遺伝子の有無を検定した。検定を行った6羽のニワトリのうち4羽(67%)にネオマイシン耐性遺伝子の増幅が確認でき、これらのニワトリがG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラニワトリであることが分かった。

【0092】(実施例20)G<sub>0</sub>トランスジェニックキメラニワトリの子孫への導入遺伝子の伝播効率

実施例19によって孵化した4羽のG<sub>0</sub>トランスジェニックキメラニワトリ(雄2羽、雌2羽)と遺伝子操作をしていないニワトリとをそれぞれ交配させ、2羽の雌のG<sub>1</sub>トランスジェニックキメラニワトリから、合計19羽のG<sub>1</sub>ニワトリ(4羽及び15羽)を得た。実施例19と同様にして、孵化した19羽のG<sub>1</sub>ニワトリの漿尿膜からゲノムDNAを調製し、PCR法により増幅し導入遺伝子の有無を検定した。その結果、2羽のG<sub>1</sub>トランスジェニックキメラニワトリからそれぞれ1羽(25%)、7羽(47%)にネオマイシン耐性遺伝子の増幅が確認でき、G<sub>1</sub>トランスジェニックニワトリであることが確認された。

【0093】

【発明の効果】本発明により、極めて高い効率で目的とする遺伝子を導入し、該遺伝子を発現するトランスジェニック鳥類を作製できる。特にニワトリ、アヒル、七面鳥、カモ、ダチョウやウズラなどの家畜として飼育されている有用鳥類のトランスジェニック鳥類を極めて高い効率で作製できる。また、本発明により感染性ウイルス粒子を放出しない安全なトランスジェニック鳥類を作出することができる。更に、本発明により所望の形質を持つ鳥類の育種法が提供される。更に、本発明によれば、遺伝子の機能が修飾された鳥類やノックアウト遺伝子を有する鳥類を効率的に生産、育種することが可能となり、機能が未知の遺伝子を鳥類に導入し、その遺伝子の機能又は遺伝子にコードされているタンパク質の機能を解明するためのトランスジェニック鳥類の作製法が提供される。また、本発明によれば、有用物質を効率的に生産することも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクトpLGRNの構造を示す。Neo'はネオマイシン耐性遺伝子を示す。P<sub>resv</sub>はラウス・

25

ザルコーマ・ウイルスのプロモーター配列を示す。GFPはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子を示す。Ψ+はパッケージングシグナル配列の存在を示す。5'LTR及び3'LTRはそれぞれMoMLVのロングターミナルリピート配列を示す。

【図2】 G<sub>1</sub>トランスジェニックキメラウズラにおける導入遺伝子存在のPCR法による検定の結果を示す。Cは陽性コントロールを示す。Neo'はネオマイシン耐性遺伝子を示す。

【図3】 G<sub>1</sub>トランスジェニックウズラの各組織における導入ベクターのPCR法による検定の結果を示す。

Mはマーカー、C1は陽性コントロール、C2は陰性コントロールを示す。L、H、T、P、B及びSは、それぞれ肝臓、心臓、生殖巣、脾臓、脳、表皮を示す。Neo'はネオマイシン耐性遺伝子を示し、GFPはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子を示す。

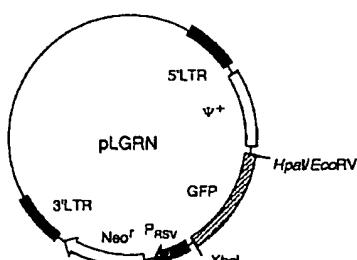
【図4】 サザン blotによるG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラにおける導入遺伝子の解析の結果を示す。レー\*

26

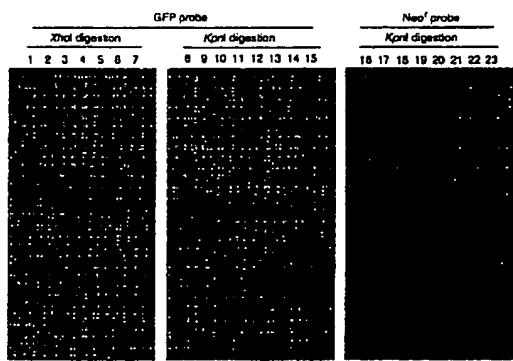
\*ン1-15はGFPプローブを用いてサザン blotを行った。レーン16-23はNeo'プローブを用いてサザン blotを行った。レーン1-7はXbaI切断、レーン8-23はKpnI切断したDNAを用いた。レーン1-6、9-14及び17-22は6羽のG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラDNAを、レーン7、15、23は遺伝子操作を行っていないウズラDNAを（ネガティブコントロール）、レーン8、16は複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクトpLGRN（ポジティブコントロール）をそれぞれの制限酵素で切断した後に電気泳動し、それぞれのプローブを用いてサザン blotした結果を示す。

【図5】 RT-PCR法によるG<sub>1</sub>トランスジェニックウズラ及びG<sub>2</sub>トランスジェニックウズラにおける導入遺伝子の各組織での発現の解析結果を示す。mはマーカーを示す。H、B、L、M、K、S及びGはそれぞれ心臓、脳、肝臓、筋肉、腎臓、脾臓及び生殖巣を示す。

【図1】

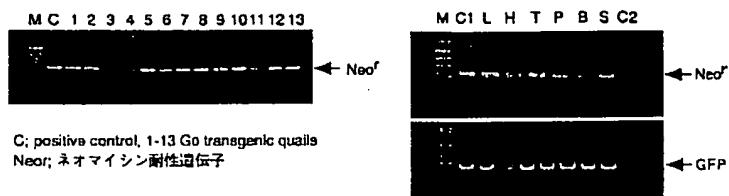


【図4】



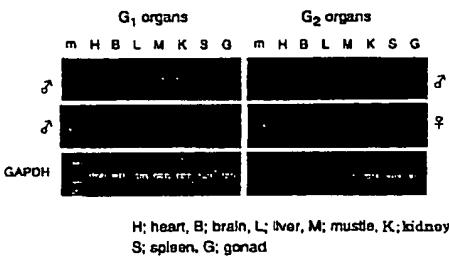
Lane 1-15: GFP プローブ (Lane 1-7: XbaI切削, Lane 8-15: KpnI切削)  
 Lane 16-23: Neo' プローブ (KpnI切削)  
 Lane 1-6, 9-14, 17-22: G<sub>1</sub>トランスジェニックウズラ (6羽)  
 Lane 7, 15, 23: 遺伝子操作をしていないウズラ (ネガティブコントロール)  
 Lane 8, 16: プラスミドpLGRN (ポジティブコントロール)

【図2】



C1: positive control, 1-13 Go transgenic quails  
 Near; ネオマイシン耐性遺伝子  
 Neo'; ネオマイシン耐性遺伝子  
 GFP; グリーン、フルオレッセント、  
 プロテイン遺伝子

【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 水洗 慎司  
愛知県名古屋市千種区幸川町2-43フォー  
ブル若竹101

(72)発明者 小野 健一郎  
愛知県名古屋市千種区東山通3丁目22番地  
プライムコート東山4B号  
Fターム(参考) 4B024 AA10 BA80 CA04 DA02 EA02  
FA10 FA11 GA12 HA01  
4B065 AA90X AA90Y AC10 BA02  
BA04 CA24 CA60

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**